

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

by: Brian Fish

**TITLE: CHIMERIC IMMUNOGLOBULINS SPECIFIC FOR p55 TAC PROTEIN
OF THE IL-2 RECEPTOR**

ABSTRACT:

The present invention provides novel compositions useful, for example, in the treatment of T-cell mediated human disorders, the compositions containing human-like immunoglobulins specifically capable of blocking the binding of human IL-2 to its receptor and/or capable of binding to the p55 Tac protein on human IL-2 receptors. The immunoglobulins can have two pairs of light chain/heavy chain complexes, typically at least one pair having chains comprising mouse complementarity determining regions functionally joined to human framework region segments. For example, mouse complementarity determining regions, with or without additional naturally-associated mouse amino acid residues, can be used to produce human-like antibodies capable of binding to the human IL-2 receptor at affinity levels stronger than about 10^8 M^{-1} .

The immunoglobulins, including binding fragments and other derivatives, of the present invention may be produced by a variety of recombinant DNA techniques, with ultimate expression in transfected cells, preferably immortalized eukaryotic cells, such as myeloma or hybridoma cells. Polynucleotides comprising a first sequence coding for human-like immunoglobulin framework regions and a second sequence set coding for the desired immunoglobulin complementarity determining regions can be produced synthetically or by combining appropriate cDNA and genomic DNA segments.

The human-like immunoglobulins may be utilized alone in substantially pure form, or complexed with a cytotoxic agent, such as a radionuclide, a ribosomal inhibiting protein or a cytotoxic agent active at cell surfaces. All of these compounds will be particularly useful in treating T-cell mediated disorders. The human-like immunoglobulins or their complexes can be prepared in a pharmaceutically accepted dosage form, which is dependent on the mode of administration.

The present invention also provides novel methods for designing human-like immunoglobulin chains having one or more complementarity determining regions (CDR's) from a donor immunoglobulin and a framework region from a human immunoglobulin, the preferred methods comprising first comparing the framework or variable region amino acid sequence of the donor immunoglobulin to corresponding sequences in a collection of human immunoglobulin chains, and selecting as the human immunoglobulin one of the more homologous sequences from the collection. The human immunoglobulin, or acceptor immunoglobulin, sequence is typically selected from a collection of at least 10 to 20 immunoglobulin chain sequences, and usually will have the highest homology to the donor immunoglobulin sequence of any sequence in the collection. The human immunoglobulin framework sequence will typically have about 65 to 70% homology or more to the donor immunoglobulin framework sequences. The donor immunoglobulin may be either a heavy chain or light

chain (or both), and the human collection will contain the same kind of chain. A humanized light and heavy chain can be used to form a complete humanized immunoglobulin or antibody, having two light/heavy chain pairs, with or without partial or full-length human constant regions and other proteins.

In another embodiment of the present invention, either in conjunction with the above comparison step or separately, additional amino acids in an acceptor immunoglobulin chain may be replaced with amino acids from the CDR-donor immunoglobulin chain. More specifically, further optional substitutions of a human framework amino acid of the acceptor immunoglobulin relying on a framework amino acid from a donor immunoglobulin will be made at positions in the immunoglobulins where:

- (a) said amino acid in the human framework region of an acceptor immunoglobulin is rare for that position and the corresponding amino acid in the donor immunoglobulin is common for that position in human immunoglobulin sequences; or
- (b) said amino acid is immediately adjacent to one of the CDR's; or
- (c) said amino acid is predicted to be within about 3Å of the CDR's in a three-dimensional immunoglobulin model and capable of interacting with the antigen or with the CDRs of the humanized immunoglobulin.

The humanized immunoglobulin chain will typically comprise at least about 3 amino acids from the donor immunoglobulin in addition to the CDR's, usually at least one of which is immediately adjacent to a CDR in the donor immunoglobulin. The heavy and light chains may each be designed by using any one or all three of the position criteria.

When combined into an intact antibody, the humanized light and heavy chains of the present invention will be substantially non-immunogenic in humans and retain substantially the same affinity as the donor immunoglobulin to the antigen (such as a protein or other compound containing an epitope). These affinity levels can vary from about 10^8 M^{-1} or higher, and may be within about 4 fold of the donor immunoglobulin's original affinity to the antigen.

⑬ 公表 平成4年(1992)5月7日

⑭ Int. Cl.¹

C 12 P 21/08

識別記号

庁内整理番号

8214-4B
8717-4B
7236-4B

審査請求 未請求

予備審査請求 有
C 12 N 15/00
5/00

部門 (区分) 1 (1)

A
B※

(全 16 頁)

⑯ 発明の名称 IL-2 レセプターの p55 Tac タンパク質に特異的なキメラ免疫グロブリン

⑰ 特 願 平2-503677

⑱ 出 願 平1(1989)12月28日

⑲ 英文提出日 平3(1991)5月1日

⑳ 国際出願 PCT/US89/05857

㉑ 国際公開番号 WO90/07861

㉒ 国際公開日 平2(1990)7月26日

優先権主張 ⑳ 1988年12月28日 ㉑ 米国 (U S) ㉒ 290,975

⑳ 発 明 者 クイーン, カリー エル.

アメリカ合衆国, カリフォルニア 94304, パロ アルト, オーク
クリーク ドライブ 1300

㉑ 出 願 人 プロテイン デザイン ラブ
ス, インコーポレイテッド

アメリカ合衆国, カリフォルニア 94304, パロ アルト, ボータ
ー ドライブ 3181

㉒ 代 理 人 弁理士 青木 朗 外3名

㉓ 指 定 国

AT, AT (広域特許), AU, BB, BE (広域特許), BF (広域特許), BG, BJ (広域特許), BR, CF (広域特許), CG (広域特許), CH, CH (広域特許), CM (広域特許), DE, DE (広域特許), DK, ES (広域特許), FI, FR (広域特許), GA (広域特許), GB, GB (広域特許), HU, IT (広域特許), JP, KP, KR, LK, LU, LU (広域特許), MC, MC, ML (広域特許), MR (広域特許), MW, NL, NL (広域特許), NO, RO, SD, SE, SE (広域特許), SN (広域特許), SU, TD (広域特許), TG (広域特許)

最終頁に続く

請求の範囲

1. p55 Tac タンパク質と特異的に反応する実質的に純粋なヒト免疫グロブリンを含んで成る組成物。

2. 前記免疫グロブリンが2対の軽鎖/重鎖二量体を含んで成り、各鎖が可変領域と定常領域を含んで成る、請求項1に記載の組成物。

3. ヒトインターロイキン-2 (IL-2) レセプターへのヒトIL-2の結合を阻害することができる実質的に純粋なヒト免疫グロブリンを含んで成る組成物。

4. 前記免疫グロブリンが約 $10^6 M^{-1}$ またはそれより強いヒトインターロイキン-2 (IL-2) への結合親和性を示す、請求項1に記載の組成物。

5. 前記免疫グロブリンが1つの免疫グロブリンからの相補性決定領域および少なくとも1つの異なる免疫グロブリンからのフレームワーク領域を含んで成る、請求項1に記載の組成物。

6. ヒトフレームワーク領域および天然には該フレームワークと関連がない1または複数の外来の相補性決定領域を含んで成る組換え免疫グロブリン組成物であって、前記免疫グロブリンがヒトインターロイキン-2 レセプターに結合することができる組成物。

7. 前記免疫グロブリンがIgG免疫グロブリンタイプである、請求項5に記載の組成物。

8. 成熟軽鎖および重鎖可変領域タンパク質配列が図3お

よび図4中の成熟タンパク質配列と実質的に相同である、請求項6に記載の組成物。

9. 2対の軽鎖/重鎖二量体を有し且つ少なくとも約 $10^6 M^{-1}$ の親和力でヒトインターロイキン-2 レセプター上のエピトープと特異的に反応することができるヒト免疫グロブリンであって、前記軽鎖および重鎖が相補性決定領域 (CDR) とヒトフレームワーク領域を含んで成り、ここでCDRが該フレームワーク領域とは異なる免疫グロブリンからのものである、ヒト免疫グロブリン。

10. ヒトインターロイキン-2 (IL-2) レセプターへのインターロイキン-2 (IL-2) の結合を阻止することができる、請求項9に記載の免疫グロブリン。

11. ヒトインターロイキン-2 レセプターに結合することができるヒト免疫グロブリンであって、前記免疫グロブリンはヒトフレームワーク中に抗-Tac 抗体からの1または複数の相補性決定領域 (CDR) を含んで成り、ここで前記ヒトフレームワーク領域は抗-Tac 抗体から選択された少なくとも1つのアミノ酸を含んで成る、ヒト免疫グロブリン。

12. 図3に示されるような成熟重鎖可変配列、および図4に示されるような成熟軽鎖可変配列を有する、請求項11に記載のヒト免疫グロブリン。

13. 抗-Tac 抗体からの追加のアミノ酸がCDRのすぐ近くに存在する、請求項11に記載のヒト免疫グロブリン。

14. ヒト免疫系においてT細胞介在性障害を処置する方法であって、前記患者に治療有効量の請求項1に記載の免疫グ

ロブリンを投与することを含んで成る方法。

15. ミニローマまたはハイブリドーマ細胞中で生成された請求項1に記載の免疫グロブリン。

16. ヒト免疫グロブリンフレームワーク領域をコードする第一の配列および1または複数のマウス免疫グロブリン相補性決定領域をコードする第二の配列を含んで成るポリヌクレオチド分子であって、発現時に p55 Tacタンパク質と特異的に反応し且つヒトT細胞上のインターロイキン-2レセプター (IL-2) へのIL-2の結合を阻止することができる免疫グロブリンをコードする前記ポリヌクレオチド分子。

17. 請求項16のポリヌクレオチドによりトランスフェクトされた細胞系。

18. 供与体1gからの1または複数の相補性決定領域およびヒト1gからのフレームワーク領域を有するヒト化免疫グロブリン組の設計方法であって、供与体1g細胞または重組のフレームワークまたは可変領域のアミノ酸配列をヒト1g細胞のコレクション中の対応する配列と比較し；そしてヒト1g細胞または重組のフレームワークを提供するためにコレクションからの約3つの最も相溶性の配列のうちの1つを選択することを含んで成る方法。

19. ヒト受容体免疫グロブリンからのフレームワーク領域および抗原に結合することができる供与体免疫グロブリンからの相補性決定領域(CDR)を有するヒト化免疫グロブリン組の設計方法であって、下記のような免疫グロブリン中の位置において、受容体免疫グロブリンの少なくとも1つのヒトフ

レームワークアミノ酸を供与体免疫グロブリンからの対応するアミノ酸で置換する段階を含んで成る方法；

(a) 受容体免疫グロブリンのヒトフレームワーク領域中のアミノ酸がその位置においてまれであり、そして供与体免疫グロブリンの対応するアミノ酸がヒト免疫グロブリン配列中の前記位置において普通である；または

(b) 該アミノ酸がCDRの1つのすぐ近くである；または

(c) 該アミノ酸が三次元免疫グロブリンモデルにおいてCDRの約3人以内に側鎖原子を有しそして抗原またはヒト化免疫グロブリンのCDRと相互作用することができると予想される。

20. 前記ヒト化免疫グロブリン組が、CDRに加えて、該組(a)、(b)または(c)により選択された供与体免疫グロブリンからの少なくとも3アミノ酸を含んで成る、請求項19に記載の方法。

21. 供与体から置換されたアミノ酸のうちの少なくとも1つがCDRのすぐ近くである、請求項20に記載の方法。

22. 請求項18、19または20に従って設計されたヒト化免疫グロブリン。

明 細 書

IL-2レセプターの p55 Tacタンパク質に 特異的なキメラ免疫グロブリン

発明の分野

本発明は一般に、新規治療薬を開発するための遺伝子DNA技術とモノクローナル抗体技術の組合せに関し、更に詳しくは、非免疫原性抗体の製造およびそれらの利用に関する。

発明の背景

哺乳類では、外来物質、即ち抗原、と特異的に相互作用する2つのタイプの細胞によって免疫応答が媒介される。それらの細胞タイプの1つであるB細胞は、抗体の生産を担う。第二の細胞クラスであるT細胞は、B細胞とT細胞を含む広範な他の造血細胞の両者の生体内機能を調節する様々な細胞サブセットを包含する。

T細胞がこの調節に力を及ぼす1つの方法は、最初にはT細胞増殖因子と命名されたインターロイキン-2 (IL-2) として知られるリンホカインの生産を通してである。IL-2の主な機能はT細胞の刺激と維持であると思われる。実際、成る免疫応答者はIL-2が全免疫応答の中心にあるだろうと考えている (Farrar, J.ら, *Immunol. Rev.* 63: 123-166 (1982) 参照、これは参考として本明細書に組み込まれる)。

その生物学的作用を及ぼすために、IL-2は特異的な高

親和性膜レセプターと相互作用する (Greene, W.ら, *Progress in Hematology* 117, E. Brown編, Grune and Statton, New York (1986), 283頁)。ヒトIL-2レセプターは複雑な多量体のタンパク質であり、1本の鎖は Tacペプチドとして知られ約55kDのサイズである (Leonard, W.ら, *J. Biol. Chem.* 260: 1872 (1985) 参照、これは参考として本明細書に組み込まれる)。このタンパク質をコードする遺伝子が単離されており、そして21アミノ酸のシグナルペプチドを含む272アミノ酸のペプチドを産生している (Leonard, W.ら, *Nature* 311: 626 (1984) 参照)。p55 Tacタンパク質のN-末端の219アミノ酸は明らかに細胞外領域を含んで成る (Leonard, W.ら, *Science* 230: 633-639 (1984) 参照、これは参考として本明細書に組み込まれる)。

ヒトIL-2レセプターの構造と機能の解明のほとんどは、特異的反応性モノクローナル抗体の開発のためである。特に、抗-Tacとして知られるマウスモノクローナル抗体 (Uchiyamaら, *J. Immunol.* 126: 1393 (1981)) は、IL-2レセプターがT細胞上だけでなく、単核-マクロファージ群、肝臓のクッパー細胞、皮膚のランゲルハンス細胞およびもちろん活性化されたT細胞上でも検出され得ることを示した。重要なことには、静止T細胞、B細胞または陽性しているマクロファージは、典型的にはIL-2レセプターを提示しない (Herrmannら, *J. Exp. Med.* 162: 1111 (1985))。

抗-Tacモノクローナル抗体は、IL-2相互作用を必要とするリンパ線細胞を明らかにするために用いられており、

そして細胞培養における細胞毒性およびナブレッナー-Tリンパ球の発育を含む様々なT細胞機能を抑制することが示されている。また、抗-Tac および他の抗体を用いた研究に基づき、様々な障害、特に成人T細胞白血病がT細胞による不適当なIL-2レセプター発現に関与づけられている。

より最近になって、IL-2レセプターはT細胞介在性疾患に対する新規治療アプローチの理想的な標的であることが示された。IL-2レセプター特異的抗体、例えば抗-Tacモノクローナル抗体を単独または免疫複合体（例えばリシンA鎖、同位体等との免疫複合体）として用いて、IL-2レセプターを有する細胞を効果的に除去できることが提唱されている。例えばそれらの薬剤は、理論上はIL-2レセプターを発現している白血病細胞、或る種のB細胞、または病状に関与する活性化されたT細胞を排除することができ、その上さらに必要とされる時には成熟正常T細胞およびその前駆体の保持によって正常T細胞免疫応答を開始する能力を促進する。一般に、他のT細胞特異的薬剤の多くは本質的に全ての周囲のT細胞を破壊し得、このことは薬剤の治療効果を制限する。全体に、IL-2レセプターに特異的な適当なモノクローナル抗体の使用は、自己免疫疾患、器官移植および活性化されたT細胞による任意の望ましくない患者において薬理的効用を有することができる。実際、例えば抗-Tac抗体を使って臨床試験が開始されている（一般に、Waldman, T.ら、*Cancer Res.* 45: 625 (1985)およびWaldman, T., *Science* 232: 727-732 (1986)を参照のこと；これらは参

考として本明細書中に組み込まれる）。

不運にも、抗-Tac および他の非ヒトモノクローナル抗体の使用は、特に下記に説明されるような繰り返しの治療法において、幾つかの欠点を有する。例えば、マウスモノクローナル抗体はヒト細胞を十分に結合せず、そしてヒトにおいて使用すると他の重要な免疫グロブリン機能特性を欠く。

おそらくより重要なのは、抗-Tac および他の非ヒトモノクローナル抗体が、ヒト患者に注入すると免疫原性となるであろう実質的長さのアミノ酸配列を含むことである。外来抗体の注入後、抗体に対して患者により惹起された免疫応答が非常に強力であり、最初の処置後の抗体の治療効用を本質的に排除しうることを多数の研究が示している。更に、様々な病気を処置するために増加する数の異なるマウスまたは他の抗原性（ヒトに対して）モノクローナル抗体が調製されるのが期待されるので、任意の異なる非ヒトモノクローナル抗体での第一または第二の処置後、無関係の治療のためさえもその後の処置が無効または危険になり得る。

いわゆる「キメラ抗体」（例えば、ヒト定常領域に連結されたマウス可変領域）は幾らか好結果であることが判明したが、重要な免疫原性の問題が残っている。一般に、多数のヒト抗原と同じく、ヒトIL-2レセプターと反応するヒト免疫グロブリンの生産は、典型的なヒトモノクローナル抗体生産技術を使うことは非常に困難である。同様に、いわゆる「ヒト化された」抗体（例えばEPO公開No.0239400を参照のこと）を作製するために組換えDNA技術を使用すること

は、一部は予想不可能な結合親和性のためである不確かな結果を提供する。

従って、ヒトにおいて実質的に非免疫原性であり、さらに治療剤および他の用途に適合する形態において容易に且つ経済的に生産される改良形のヒト免疫グロブリン、例えばヒトIL-2レセプターに特異的なもの、に対する要求が存在する。本発明はそれらおよび他の要求を満たす。

発明の要約

本発明は、例えばT細胞により媒介されるヒト障害の処置において有用である新規組成物を提供し、該組成物は、IL-2レセプターへのヒトIL-2の結合を特異的に阻止することができそして/またはヒトIL-2レセプター上のp55 Tacタンパク質に結合することができるヒト免疫グロブリンを含有する。該免疫グロブリンは、2対の軽鎖/重鎖複合体を有し、典型的には少なくとも1対がヒトフレームワーク領域セグメントに機能的に連結されたマウス相補性決定領域を含んで成ることを有する。例えば、追加の天然由来のマウスアミノ酸残基を有するかまたは有しないマウス相補性決定領域を用いて、約 $10^6 M^{-1}$ よりも強力な親和力レベルにおいてヒトIL-2レセプターに結合することができるヒト抗体を生産することができる。

結合性断片または他の誘導体を包含する免疫グロブリンは、様々な組換えDNA技術により、トランスフェクトされた細胞、好ましくは不死化された真核細胞、例えばミエロマエ

またはハイブリドーマ細胞中での最大発現を使って生産することができる。ヒト免疫グロブリンフレームワーク領域をコードする第一の配列と所望の免疫グロブリン相補性決定領域をコードする第二の配列を含んで成るポリヌクレオチドは、合成的にまたは適当なcDNAとゲノムDNAセグメントを融合することによって作製することができる。

ヒト免疫グロブリンは、実質的に様々な形態で単独に、または細胞毒性物質、例えば放射性核種、リポソーム阻害タンパク質もしくは細胞表面において毒性な細胞毒性物質と複合体化して、使用することができる。それらの化合物は全て、特にT細胞により媒介される障害を処置することにおいて有用であろう。ヒト免疫グロブリンまたはそれらの複合体は、投与の形式に依存するであろう薬理上許容される形態において調製することができる。

本発明は、供与体免疫グロブリンからの1または複数の相補性決定領域(CDR)およびヒト免疫グロブリンからのフレームワーク領域を有するヒト免疫グロブリン鎖を設計するための新規方法も提供する。好ましい方法は、供与体免疫グロブリンのフレームワークまたは可変領域のアミノ酸配列をヒト免疫グロブリン鎖のコレクション中の対応する配列と比較し、そして該コレクションからより相同性の高い配列の1つをヒト免疫グロブリンとして選択することを含んで成る。ヒト免疫グロブリンまたは受容体免疫グロブリン配列は、典型的には少なくとも10-20の免疫グロブリン鎖配列のコレクションから選択され、そして通常は該コレクション中のいずれ

かの配列の供与体免疫グロブリン配列に最も高い相関性を有するだろう。ヒト免疫グロブリンフレームワーク配列は、供与体免疫グロブリンフレームワーク配列に対して典型的には約65~70%またはそれ以上の相関性を有するだろう。供与体免疫グロブリンは重鎖または軽鎖（または両方）のいずれであってもよく、そしてヒトコレクションは同じ種類の鎖を含むだろう。ヒト化された軽鎖または重鎖を用いて、部分または全長のヒト定常領域および別のタンパク質を含むかまたは含まない、2対の軽鎖/重鎖を有する完全なヒト化免疫グロブリンまたは抗体を形成せしめることができる。

本発明の別の態様によれば、上記の比較段階と共にまたは別々に、受容体免疫グロブリン中の追加のアミノ酸をCDR-供与体免疫グロブリン鎖からのアミノ酸と置き換えることができる。更に特定のには、供与体免疫グロブリンからのフレームワークアミノ酸による受容体免疫グロブリンのヒトフレームワークアミノ酸の異なる任意の置換は、次のような免疫グロブリン中の位置において行うことができる：

(a) 受容体免疫グロブリンのヒトフレームワーク領域中の該アミノ酸がその位置に稱であり、そして供与体免疫グロブリン中の対応するアミノ酸がヒト免疫グロブリン中のその位置に普通である；

(b) 該アミノ酸がCDRの1つのすぐ近くである；または

(c) 該アミノ酸が三次元免疫グロブリンモデルにおいてCDRの約3Å以内にあり、そしてヒト化免疫グロブリンの

CDRまたは抗原と相互作用することができると予想される。

ヒト化免疫グロブリン鎖は、典型的には、CDRに加えて供与体免疫グロブリンからの少なくとも約3アミノ酸を含んでおり、通常は少なくともその1つが供与体免疫グロブリン中のCDRのすぐ近くであろう。3つの位置基準のうちのいずれか1つまたは全部を使うことにより重鎖および軽鎖を各々設計することができる。

完全な抗体に結合される時、本発明のヒト化された軽鎖および重鎖はヒトにおいて実質的に非抗原性であり、そして供与体免疫グロブリンと実質的に同じ抗原（例えばエヒトープを含むタンパク質または他の化合物）への親和力を保持しているだろう。それらの親和力レベルは約 $10^{-6}M^{-1}$ 以上から種々に異なることができ、そして抗原への供与体免疫グロブリンのものと親和力の約4倍以内であろう。

図面の簡単な説明

図1：抗-Tac 重鎖（上行）およびEu重鎖（下行）の配列の比較。アミノ酸の1文字記号が用いられている。各行の最初のアミノ酸に左側に番号を付けてある。2つの配列中の同じアミノ酸は線でつながれている。3つのCDRには下線が付してある。ヒト化抗-Tac 重鎖においてEuアミノ酸よりもむしろ抗-Tac アミノ酸が使用された他のアミノ酸位置は★で示されている。

図2：抗-Tac 軽鎖（上行）およびEu軽鎖（下行）の配列の比較。アミノ酸の1文字記号が用いられている。各行の

最初のアミノ酸に左側に番号を付けてある。2つの配列中の同じアミノ酸は線でつながれている。3つのCDRには下線が付してある。ヒト化抗-Tac 重鎖においてEuアミノ酸よりもむしろ抗-Tac アミノ酸が使用された他のアミノ酸位置は★で示されている。

図3：ヒト化抗-Tac 重鎖可変領域遺伝子のヌクレオチド配列。タンパク質をコードする遺伝子の部分についての翻訳アミノ酸配列がヌクレオチド配列の下に示されている。該遺伝子の始まりと終わりのヌクレオチドTCTAGAはIbaI 部位である。成熟重鎖配列はアミノ酸#20のQで始まる。

図4：ヒト化抗-Tac 軽鎖可変領域遺伝子のヌクレオチド配列。タンパク質をコードする遺伝子の部分についての翻訳アミノ酸配列がヌクレオチド配列の下に示されている。該遺伝子の始まりと終わりのヌクレオチドTCTAGAはIbaI 部位である。成熟軽鎖配列はアミノ酸#21のDで始まる。

図5：A、ヒト化抗-Tac 重鎖遺伝子を合成するのに用いた、5' から3' 方向に記載した4つのオリゴヌクレオチドの配列。B、前記オリゴヌクレオチドの相対位置。矢印は各オリゴヌクレオチドの3' 方向を指している。

図6：(A) ヒト化抗-Tac 軽鎖遺伝子を合成するのに用いた、5' から3' 方向に記載した4つのオリゴヌクレオチドの配列。(B) 前記オリゴヌクレオチドの相対位置。矢印は各オリゴヌクレオチドの3' 方向を指している。JF02とJF03とのオーバーラップ中のIbaI 部位の位置が示されている。

図7：ヒト化抗-Tac 重鎖を発現させるのに用いるプラスミドpHsGTACIの略図。関係する制限部位が示されており、そして重鎖のコード領域が箱として表示されている。免疫グロブリン(Ig)プロモーターからの転写方向が矢印により示されている。E、= 重鎖ニッケンター、Hyg=ヒドロマイシン耐性遺伝子。

図8：ヒト化抗-Tac 軽鎖を発現させるのに用いるプラスミドpHsLTACIの略図。関係する制限部位が示されており、そして軽鎖のコード領域が箱として表示されている。Igプロモーターからの転写方向が矢印により示されている。

図9：抗-Tac 抗体またはヒト化抗-Tac 抗体に次いで標識としてフルオレセイン接合ヤギ抗マウスIg抗体またはヤギ抗ヒトIg抗体でそれぞれ染色された Hst-102 および Jurkat細胞のフルオロサイトメトリー。各パネルにおいて、点線曲線は第一抗体が削除された時の結果を示し、実線曲線は記載された第一および第二（結合）抗体を含む時の結果を示す。

図10：(A) 指摘されるような0~40nxの抗-Tac、次いでビオチン化抗-Tac、次にフィコニトリン接合アビジンで染色された Hst-102 細胞のフルオロサイトメトリー。(B) 指摘の抗体、次いでビオチン化抗-Tac、次にフィコニトリン接合アビジンで染色された Hst-102 細胞のフルオロサイトメトリー。

発明の詳細な記載

本発明の一態様によれば、所望のエピトープ、例えばヒト T 細胞上の I L-2 レセプター上のエピトープ、と特異的に反応するヒト免疫グロブリンが提供される。これらの免疫グロブリンは、少なくとも約 $10^4 M^{-1}$ 、好ましくは $10^5 M^{-1}$ ~ $10^6 M^{-1}$ またはそれ以上の結合親和力を有し、例えばヒト I L-2 レセプターへの I L-2 の結合を阻止することができる。ヒト免疫グロブリンは、ヒトフレームワークを有し、そして p55 Tac タンパク質上のエピトープと特異的に反応する免疫グロブリン、典型的にはマウス免疫グロブリンからの相補性決定領域(CDR)を有することができる。本発明の免疫グロブリンは、経皮的に大量に生産することができ、例えば、種々の技術によるヒト患者における T 細胞介在性障害の処置において、用途を見出す。

基本的な抗体構造単位は 4 量体を含むことが知られている。各 4 量体は全く同じ 2 対のポリペプチド鎖から成り、各対は 1 本の「軽」(約 25kD) 鎖と 1 本の「重」(約 50-70kD) 鎖を有する。各鎖の NH₂-末端は、主に抗原認識を担う約 100 ~ 110 またはそれ以上のアミノ酸の可変領域で始まる。各鎖の COOH-末端は、主にエフェクター機能を担う定常領域で終結する。

軽鎖は κ または λ のいずれかとして分類される。重鎖は γ 、 μ 、 α 、 δ または ϵ として分類(および細分類)され、そしてそれぞれ IgG、IgM、IgA、IgD および IgE として抗体のイソタイプを規定する。軽鎖および重鎖中の可変および定常領域

は、約 12 またはそれより多数のアミノ酸の「J」領域により連結され、重鎖は約 12 またはそれより多数のアミノ酸の「D」領域も含む(一般に、*Fundamental Immunology*, Paul W. 編、第 2 巻、第 131-166 頁、Raven Press, N.Y. (1984) を参照のこと；これは参考として本明細書中に組み込まれる)。

各軽鎖/重鎖対の可変領域は抗原結合部位を形成する。鎖は全て、3 つの超可変領域によって結合された比較的保存されたフレームワーク領域という同じ一般構造を示す("Sequences of Proteins of Immunological Interest", Kabat, E. 編、U.S. Department of Health and Human Services, (1933)；並びに Chothia および Lesk, *J. Mol. Biol.*, 196: 901-917 (1987) を参照のこと。これらは参考として本明細書中に組み込まれる)。各対の二本鎖からの CDR は、フレームワーク領域によって整列され、特異的エピトープへの結合を可能にする。

本明細書中で使用する「免疫グロブリン」なる用語は、免疫グロブリン遺伝子により実質的にコードされる 1 または複数のポリペプチドから成るタンパク質について呼称する。認識される免疫グロブリン遺伝子としては、 κ 、 λ 、 α 、 γ 、 δ 、 ϵ および μ 定常領域遺伝子、並びに無数の免疫グロブリン可変領域遺伝子が挙げられる。免疫グロブリンは抗体の他に様々な形態で存在することができ、例えば、Fr. Fab および F(ab)₂、並びに一本鎖を包含する(例えば、Reston 等、*Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 85: 5879-5883 (1988) および Bird 等、*Science*, 242: 423-426 (1988)。これらは参考として本明

細書中に組み込まれる)。[一般に、Rood 等、"Immunology", Benjamin, N.Y., 第 2 版(1984)；並びに Hunkapiller および Hood, *Nature*, 323: 15-16 (1985) を参照のこと。これらは参考として本明細書中に組み込まれる。]

キメラ抗体は、典型的には遺伝子操作によって軽鎖および重鎖遺伝子が異なる鎖に属する免疫グロブリン遺伝子セグメントから作製されている抗体である。例えば、マウスモノクローナル抗体由来の遺伝子の可変(V)セグメントをヒト定常(C)セグメント、例えば γ 、および μ 、に結合することができる。典型的な型化用キメラ抗体はマウス抗体からの V または抗原結合領域とヒト抗体からの C またはエフェクター領域とから成るハイブリッドタンパク質である(例えば、A. I. C. C. 登録番号 CRL 9688 は抗-Tac キメラ抗体を分泌する)が、他の哺乳動物種を使用することもできる。

本明細書中で使用する「フレームワーク領域」なる用語は、Kabat 等、前掲により定義されたように、単一鎖において異なる免疫グロブリン間で比較的に保存される免疫グロブリン鎖および重鎖可変領域の部分について呼称する。本明細書中で使用する「ヒトフレームワーク領域」なる用語は、各々存在する鎖においてヒト免疫グロブリン中のものと等しい少なくとも約 70 またはそれ以上のアミノ酸残基、典型的には 75 ~ 85 またはそれ以上のアミノ酸残基を含んで成るフレームワーク領域である。

本明細書中で使用する「ヒト免疫グロブリン」なる用語は、ヒトフレームワーク領域を含んで成る免疫グロブリン

について言及し、この場合、存在する任意の定常領域がヒト免疫グロブリン定常領域と実質的に相同であり、即ち少なくとも約 85 ~ 90%、好ましくは約 95% が同一である。よって、おそらく CDR を除くヒト免疫グロブリンの全ての部分が、1 または複数の生来のヒト免疫グロブリン配列の対応部分と実質的に相同である。例えば、ヒト免疫グロブリンはマウス可変領域/ヒト定常領域キメラ抗体を包含しないだろう。

本発明の別の一般的観点によれば、ヒト化された免疫グロブリン鎖を含んで成る抗体の親和力を増加させるために、ヒト鎖またはヒト化免疫グロブリン鎖のフレームワーク中の限定された数のアミノ酸が受容体 I g よりもむしろ供与体 I g 中のそれらの位置のアミノ酸と同じであるように選択される基準も含まれる。

本発明のこの観点は、(例として CDR の入手品としてマウス抗体を使って)ヒト化抗体を生産する従来方法における親和力の低下の 2 つの原因が、下記のためであるというモデルに基づく：

(1) マウス CDR をヒトフレームワークと結合する時、CDR に密接したフレームワーク中のアミノ酸がマウスの代わりにヒトになる。理論に結び付けようとせずに、本発明者らは、それらの変更されたアミノ酸が供与体マウス抗体中とは異なる静電的または疎水的力を生じるため、それらがわずかに CDR を歪め、そして歪められた CDR は供与抗体中の CDR が行うのと同じくらい効果的な抗原との接触を行うことができないと考える；

(2) また、CDRに密着しているがその一部ではない(即ちまだフレームワークの一部である)元のマウス抗体中のアミノ酸は、親和力の基因である抗原との接触を計うことができる。全てのフレームワークアミノ酸がヒトにされるので、抗体がヒト化される時にそれらのアミノ酸は失われる。

それらの問題を回避するため、および所望の抗原に対し非常に強力な親和力を有するヒト化抗体を生産するために、本発明はヒト化免疫グロブリンを設計するのに次の4つの基準を使用する。それらの基準を単独でまたは必要な時に組み合わせ使用し、所望の親和力または他の特徴を獲得することができる。

基準I: 受容体として、ヒト化しようとする供与体免疫グロブリンに非常に相同である特定のヒト免疫グロブリンからのフレームワークを使用するか、または多数のヒト抗体からの共通のフレームワークを使用すること。例えば、データバンク(例えばNational Biomedical Research Foundation Protein Identification Resource)中のヒト重鎖(軽鎖)可変領域に対するマウス重鎖(軽鎖)可変領域の配列の比較は、異なるヒト領域に対する相同性の程度が典型的には約40%から約60-70%まで大幅に異なることを示す。受容体免疫グロブリンとして、供与体免疫グロブリンの重鎖(それぞれ軽鎖)に最も相同であるヒト重鎖(それぞれ軽鎖)の1つを選択することにより、供与体免疫グロブリンから受容体免疫グロブリンに移る際にはほとんどアミノ酸が変化しないであろう。よって、ヒト化免疫グロブリン鎖を含んで成るヒト化抗体の正

確な全形状が供与抗体の形状と非常によく似ており、CDRを認める見込みを減らすことができる。

典型的には、重鎖フレームワークを提供するために、少なくとも約10-20の別個のヒト重鎖の代表的コレクションの中の3-5の最も相同な重鎖可変領域配列のうちの1つが受容体として選択され、軽鎖についても同様にして選択されるだろう。好ましくは、1-3の最も相同な領域のうちの1つが使用されるだろう。選択された受容体免疫グロブリン鎖は、供与体免疫グロブリンに対してフレームワーク領域内が最も好ましくは少なくとも約65%の相同性を有するだろう。

いかにして受容体免疫グロブリンを選択するかにかかわらず、受容体よりもむしろ供与体中のそれらの位置のアミノ酸と同じになるようにヒト化免疫グロブリン鎖のフレームワーク中の少数のアミノ酸を選択することによって、より高い親和力を獲得することができる。好ましくは、それらの基準の1つを満足するほとんどまたは全てのアミノ酸位置において、供与体アミノ酸が実際に選択されるだろう。

基準II: ヒト受容体免疫グロブリンのフレームワーク中のアミノ酸が、普通でない(即ち「まれである」: 本明細書中で使用されるこの用語は、代表的なデータバンク中のヒト重鎖(それぞれ軽鎖)V領域配列のたった約10%しかその位置に存在しないアミノ酸を示す)場合、またはその位置の供与体アミノ酸がヒト配列に典型的である(即ち「普通である」: 本明細書中で使用されるこの用語は、代表的なデータバンク中の少なくとも約25%の配列に存在するアミノ酸を示す)場

合、受容体よりもむしろ供与体アミノ酸が選択されるだろう。この基準は、ヒトフレームワーク中の普通でないアミノ酸が抗体構造を破壊しないことを保証するのに役立つ。更に、普通でないアミノ酸をたまたまヒト抗体に典型的である供与体抗体からのアミノ酸で置換することにより、ヒト化抗体を低免疫原性にする事ができる。

基準III: ヒト化免疫グロブリン鎖中の3つのCDRのすぐ近くの位置において、受容体アミノ酸よりもむしろ供与体アミノ酸が選択されるだろう。それらのアミノ酸は、おそらく特にCDR中のアミノ酸と相互作用し、もし受容体から選択されれば供与体CDRを破壊しそして親和力を低下させるであろう。更に、近隣のアミノ酸は抗原と直接相互作用し(Amitら、*Science*, 233, 747-753 (1986)、これは参考として本明細書中に組み込まれる)、供与体からそれらのアミノ酸を選択することは元の抗体における親和力を提供する全ての抗原接触を維持するのに望ましいかもしれない。

基準IV: 典型的には元の供与抗体の3次元モデルは、CDRの外側の端つかのアミノ酸がCDRに密着しておりそして水素結合、ファンデルワールス力、親水的相互作用等によりCDR中のアミノ酸と相互作用する相当な確率を有することを示す。それらのアミノ酸位置では、受容体免疫グロブリンアミノ酸よりもむしろ供与体アミノ酸が選択される。この基準に従ったアミノ酸は、通常はCDR中の成る部位の約3人単位内に固着原子を有し、そして互立された化学的力、例えば上記に列挙した力に従ってCDR原子と相互作用するこ

とができるような原子を含まなければならない。抗体などのタンパク質のモデルを作成するためのコンピュータープログラムが一般に利用可能であり、そして当業者に周知である(Loeferら、*Int. J. Quant. Chem., Quant. Biol. Symp.*, 15: 55-56 (1988); Bruccoleriら、*Science*, 233: 755-758 (1986)を参照のこと。これら全てが参考として本明細書中に組み込まれる)。それらは本発明の部分を構成しない。実際、全ての抗体が類似の構造を有するので、Brookhaven Protein Data Bankから入手可能である既知の抗体を必要であれば別の抗体のモデルとして利用することができる。商業的に入手可能であるコンピュータープログラムを用いてコンピューター画面にそれらのモデルを表示し、原子間の距離を算出し、そして種々のアミノ酸相互作用の可能性を評価することができる。

ヒト化またはヒト様抗体は、ヒト抗体において使用されるマウス抗体または成る場合にはキヌラ抗体を上回る少なくとも3つの潜在的利点を有する:

1) エフェクター部分がヒトであるため、ヒト免疫系のその他の部分と良好に反応することができる(例えば、抗体依存性細胞障害作用(CDC)または抗体依存性細胞障害作用(ADCC)により、より効果的に標的細胞を破壊する)。

2) ヒト免疫系は外来物としてヒト化抗体のフレームワークまたは定常領域を認識しないであろう。従ってそのような在入抗体に対する抗体反応は全体的に外来のマウス抗体または部分的に外来のキヌラ抗体に対するよりも小さいであろう。

3) 在入されたマウス抗体は、通常の抗体の半減期よりも

ずっと短いヒト抗体中の半減期を有することが報告されている (D. Shavら, J. Immunol., **138**: 4534-4538 (1987))。注入されたヒト化抗体は、おそらく天然のヒト抗体により類似した半減期を有し、より少量または少頻度の用量を与えることを可能にするだろう。

本発明は、EPA公報No 0239400に記載されたものに関して改竄されたヒト化免疫グロブリン (例えば、ヒトIL-2レセプターに結合することができる) に特に向けられる。その出願明細書 (その開示は本発明の範囲から除かれる) は、成る種の免疫グロブリンについて、受容体抗体の軽鎖または重鎖可変領域中のCDR領域を異なる特異性の抗体からのCDRの類似部分 (典型的には溶媒の影響を受けやすい部分) で置換することを記載している。また、その出願明細書は、成る種の免疫グロブリンについて、抗原結合部位から (溶媒に) 影響されやすい残基を単に移動する可能性を記載しており、この残基は明らかに幾つかのフレームワーク領域を含むことができる (特に、Amitら, Science, **233**: 747-753 (1986)) に記載されたような抗原結合に参与することが既知である残基、またはおそらく相互作用に必須である残基—ただしそれらの選択については該出願明細書において不十分な指針しか与えられていない)。例えば、本発明の好ましい態様は、全CDRアミノ酸およびCDRの1つ (または好ましくは各々) のすぐ近くのフレームワークアミノ酸を置換することを伴う。一般に、例えばコンホメーション (および普通はそれらの抗原結合特異性) を維持するためにCDRと連絡をとる

任意のフレームワーク残基が、上記に詳細に記載された本発明の好ましい態様の範囲内に特に含まれる。

1つの観点において、本発明は、希望のエピトープ、例えばヒトIL-2レセプター上のエピトープ、に結合することができる免疫グロブリン (例えば抗-Tacモノクローナル抗体) からの重鎖および/または軽鎖CDR (典型的には上述したような別のアミノ酸残基を有する) をコードする組換えDNAセグメントに向けられる。それらの領域をコードするDNAセグメントは、典型的にはヒト様フレームワーク領域をコードするDNAセグメントに結合されるだろう。例えば、発現時に抗-Tac重鎖および軽鎖超可変領域 (ヒト様フレームワーク領域と共に) を含んで成るポリペプチド鎖をコードする好ましいDNA配列がそれぞれ図3と図4に示されている。コドン最適化および重要でないアミノ酸置換のため、後述するようにそれらの配列の代わりに他の配列を容易に用いることができる。

前記DNAセグメントは、典型的には、ヒト様抗体のコード配列に作用可能に連結した発現調節DNA配列、例えば天然由来のまたは異種のプロモーター領域、を更に含むだろう。好ましくは発現調節配列は、真核生物宿主細胞を感染転またはトランスフェクションせしめることができるベクター中の真核生物プロモーター系であろうが、原核生物宿主用の調節配列を用いることができる。ベクターが適当な宿主中に組み込まれれば、宿主はヌクレオチド配列の高レベル発現に適当な条件下で維持され、そして所望する時、軽鎖、重鎖、軽

鎖/重鎖二量体もしくは完全な抗体、結合性断片または他の免疫グロブリン形態の取得および精製を行うことができる。

ヒト定常領域DNA配列は、既知の方法に従って、種々のヒト細胞から、好ましくは不死化されたB細胞から単離することができる (Kabat, 前掲およびWP 87/02571を参照のこと)。例えば、ヒト κ 免疫グロブリン定常およびJ領域遺伝子および配列はHeiterら, Cell, **22**: 197-207 (1980)中に記載されており、そしてヒト免疫グロブリンC γ 遺伝子のヌクレオチド配列はElisonら, Nucl. Acid Res., **10**: 4071 (1982)中に記載されている (その両者は参考として本明細書中に組み込まれる)。本発明の免疫グロブリンを製作するためのCDRは、所望の抗原 (例えばヒトIL-2レセプター) に結合することができるモノクローナル抗体から同様にして誘導され、そしてマウス、ラット、ウサギまたは抗体を生産することができる他の脊椎動物を含む任意の便利な哺乳動物細胞において生産されるだろう。DNA配列の適当な起原細胞並びに免疫グロブリンの発現および分泌のための宿主細胞は、多数の入手源、例えばアフリカン・タイプ・カルチャー・コレクションから入手することができる ("Catalogue of Cell Lines and Hybridomas", 第5版 (1985) Rockville, Maryland, U.S.A.; これは参考として本明細書中に組み込まれる)。

本明細書中に特定の記載のヒト様免疫グロブリンに加えて、他の「実質的に相同の」変型免疫グロブリンを容易に設計することができ、そして当業者に周知の様々な組換えDNA

技術を使って製造することができる。例えば、IL-2レセプター免疫グロブリンについては、フレームワーク領域は幾つかのアミノ酸置換、末端および中間の付加および削除等により一次構造レベルで図3および図4の配列と異なることができる。更に、本発明のヒト様免疫グロブリンを基として、種々の異なるヒトフレームワーク領域を単独または組合せて用いることができる。一般に、遺伝子の修飾は種々の周知の技術、例えば部位特異的突然変異誘発 (GillmanおよびSmith, Gene, **8**: 81-97 (1979)) 並びにRobertsら, Nature, **323**: 731-734 (1987)を参照のこと; この両者は参考として本明細書中に組み込まれる) により容易に達成することができる。あるいは、一次抗体構造の一部のみを含んで成るポリペプチド断片を製造することができ、この断片は1または複数の免疫グロブリン活性 (例えば抗体結合活性) を有する。また多数の遺伝子と同様、免疫グロブリン関連遺伝子は、各々が1または複数の別個の生物活性を有する別々の機能性領域を含むため、該遺伝子を別の遺伝子からの機能性領域 (例えば肺炎; 1987年12月15日提出の一般譲渡されたU.S.S.N. 132,387を参照のこと。これは参考として本明細書中に組み込まれる) と融合させ、新規性質を有する融合タンパク質 (例えば免疫毒素) を製造することができる。

最終的に所望のヒト様抗体を発現することができる本発明の核酸配列は、様々な異なるポリヌクレオチド (ゲノムDNAまたはcDNA、RNA、合成オリゴヌクレオチド等) および成分 (例えばV、J、DおよびC領域) から、そして様々な異

なる技術により、形成せしめることができる。通常のゲノム配列を逆転することが現在最も一般的な製造方法であるが、cDNA配列を使用してもよい(ヨーロッパ特許公報No.6239403および Reichman, L.ら, *Nature* 332: 323-327 (1987)を参照のこと。この両者は参考として本明細書中に組み込まれる)。

前に述べたように、該DNA配列を発現調節配列に作用可能に連結した(即ち、機能を保証するように配置させた)後で該配列が宿主中で発現されるだろう。それらの発現ベクターは、典型的にはエピソードとしてまたは宿主染色体DNAの組み込み部分として宿主中で複製可能である。一般に、発現ベクターは、所望のDNA配列により形質転換された細胞の検出を可能にするために選択マーカー、例えばテトラサイクリンまたはネオマイシン耐性遺伝子を含むだろう(例えば、米国特許第4,704,362号を参照のこと:これは参考として本明細書中に組み込まれる)。

大腸菌(*E. coli*)は本発明のDNA配列をクローニングするのに特に有用な原核生物宿主である。使用に適当な他の微生物宿主としては、バクテリウム、例えばバクテリウム・サブチリス(*Bacillus subtilis*)、並びに他の細菌細胞、例えばサルモネラ菌(*Salmonella*)、セラチア菌(*Serratia*)および種々のシュードモナス菌(*Pseudomonas*)種が挙げられる。それらの原核生物宿主では、典型的には宿主細胞と適合性である発現調節配列(例えば複製開始点)を含むであろう発現ベクターを作製することもできる。加えて、任意の数の種々の周知のプロモーター、例えばラクトースプロモーター系、ト

リプトファン(*trp*)プロモーター系、タークタマーゼプロモーター系、またはメファージからのプロモーター系が存在するだろう。プロモーターは、典型的には所望によりオペレーター配列と共に発現を調節し、そして転写および翻訳を開始および終了させるためのリボソーム結合部位等を有するだろう。

他の微生物、例えば酵母を発現に用いることもできる。アッカロミセス(*Saccharomyces*)は好ましい宿主であり、適当なベクターは、発現調節配列、例えば3-ホスホグリセレートキナーゼおよび他の解糖酵素プロモーターを包含するプロモーター、並びに所望により複製開始点、終結配列等を有する。

微生物に加えて、哺乳動物細胞培養物を用いて本発明のポリペプチドを発現および生産せしめることもできる

(Winnacker, "From Genes to Clones", VCH Publishers, N. Y., N. Y. (1987)を参照のこと:これは参考として本明細書中に組み込まれる)。完全な免疫グロブリンを分泌することができる多数の適当な宿主細胞系が技術の現状において開発されているため実際には真核細胞が好ましい。そのような真核細胞としては、CHO細胞系、種々のCOS細胞系、IsLa細胞系、ミネローマ細胞系等が挙げられるが、好ましくは形質転換されたB細胞またはハイブリドーマである。それらの細胞のための発現ベクターは、発現調節配列、例えば複製開始点、プロモーター、エンハンサー(Queen, C.ら, *Immunol. Rev.* 89: 49-68 (1985):これは参考として本明細書中に組み込まれる

る)、および必要なプロセッシング情報部位、例えばリボソーム結合部位、RNAスプライス部位、ポリアダニル化部位、および転写ターミネーター配列を含むことができる。好ましい発現調節配列は、エンハンサーを有するSV40(MulliganおよびBerg, *Science* 209: 1422-1427 (1980)を参照のこと)、免疫グロブリン遺伝子、アデノウイルス、ワクチン様ウイルス等に由来するプロモーターである。

寄目のDNAセグメント(例えば、重鎖および軽鎖コード配列並びに発現調節配列)を含むベクターは、細胞宿主のタイプに依存して異なる周知の方法により、宿主細胞中に移すことができる。例えば、原核細胞には塩化カルシウムトランスフェクション法が常用され、一方他の細胞宿主にはリン酸カルシウム処理またはエレクトロポレーションが使用される(一般には、Maniatisら, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press (1982)を参照のこと:これは参考として本明細書中に組み込まれる)。

一度発現されれば、本発明の完全抗体、それらの二量体、個々の軽鎖および重鎖、または他の免疫グロブリン形態を当業界の標準法、例えば硫酸アンモニウム沈殿、アフィニティークラム、カラムクロマトグラフィー、ゲル電気泳動等に従って精製することができる(一般的には、Scopes, R., *Protein Purification*, Springer-Verlag, N. Y. (1982)を参照のこと)。少なくとも約90-95%均質の実質的に純粋な免疫グロブリンが好ましく、98-99%またはそれ以上の均質が望ましい用途に好ましい。部分的にまたは所望の時に均質まで精製

されれば、疫学的に(体外的を含む)またはアッセイ方法、免疫蛍光染色法等を開発しそして実験する際に該ポリペプチドを使用することができる(一般的には、*Immunological Methods*, 第1および2巻, LefkovitsおよびPernis編, Academic Press, New York, N. Y. (1979および1981)を参照のこと)。

本発明において例示されるIL-2レセプター特異抗体は、典型的にはT細胞介在性の病状状態を処置することにおいて個々に用いられるだろう。通常、病状に関連する細胞がIL-2レセプターを有すると同定された場合、ヒトIL-2レセプターへのIL-2の結合を阻止することができるヒト抗体が適当である("Treating Human Malignancies and Disorders"と題するU. S. S. N. 085,707を参照のこと:これは参考として本明細書中に組み込まれる)。例えば、処置に適する典型的な病状状態として、器官移植、例えば心臓、肺、腎臓、肝臓等の移植を行う患者における移植拒絶反応および対宿主性移植片病が挙げられる。他の病状としては、自己免疫疾患、例えば1型糖尿病、多発性硬化症、関節リウマチ、全身性紅斑性狼瘡および重症筋無力症が挙げられる。

本発明のヒト抗体は、別の抗体、特に病状の一因となる細胞上の別のマーカーと反応するヒトモノクローナル抗体と組合せて使用することもできる。例えば、適当なT細胞マーカーとしては、第一回国際白血球分化ワークショップ(First International Leukocyte Differentiation Workshop), *Leukocyte Typing*, Bernardら編, Springer-Verlag, N. Y.

(1984) (これは参考として本明細書中に組み込まれる) により命名されたいわゆる「分化のクラスター (Clusters of Differentiation)」中に分類されるものを挙げるができる。

抗原は、化学療法剤または免疫抑制剤と共に与えられる別々に授与される組成物として使用することができる。典型的には、そのような薬剤としては、シクロスポリンAまたはブリン類抗体 (例えばメトトレキサート、6-メルカプトプリン等) が挙げられるだろうが、当業者に周知である多数の他の薬剤 (例えばシクロホスファミド、ブレドニソン等) も使用することができる。

本発明の好ましい医薬組成物は、免疫系における抗原抗体の使用を含んで成る。免疫系は2つの成分により特徴づけられ、そして試験管内または生体内において選択細胞を殺すのに特に有用である。第一成分は、付着または吸収すると細胞に対して通常は致命的である細胞毒性物質である。「デリバリー賦形剤」として知られる第二成分は、毒性物質を特定の細胞タイプ、例えばガンを含む細胞に供給するための手段を提供する。この2成分は通常は様々な周知の化学的方法のいずれかによって一緒に化学的に結合される。例えば、細胞毒性物質がタンパク質でありそして第二成分が完全な免疫グロブリンである時、結合は異種二価性架橋剤、例えばSPCP、カルボジイミド、グルタルアルデヒド等によることができる。種々の免疫系薬の製造が当業界で周知であり、例えば「Monoclonal Antibody-Toxin Conjugates: Aiming the Magic Bullet

let', Thorpeら、Monoclonal Antibodies in Clinical Medicine, Academic Press, 158-190 (1982) に見つけることができる。これは参考として本明細書中に組み込まれる。

様々な細胞毒性物質が免疫系における使用に相当である。細胞毒性物質としては、放射性核種、例えばヨウ素-131、イットリウム-90、レニウム-188 およびビスマス-212; 多数の化学療法剤、例えばビンデシン、メトトレキサート、アドリアマイシンおよびシスプラチン; 並びに細胞毒性タンパク質、例えば、リボソーム阻害タンパク質強アモリカマゴボウ抗ウイルスタンパク質、シュードモナススルホ菌A、リシン、ジフテリア毒素、リシンA類等; または細胞表面で活性な物質、例えばホスホリパーゼ酵素 (例えばホスホリパーゼC) を挙げることができる。[1988年12月23日に提出された一般願号されたU.S.S. 8,07/290,952; 'Chimeric Toxins', OlsnesおよびPhil, Pharmac. Ther., 25: 355-381 (1982); 並びに「Monoclonal Antibodies for Cancer Detection and Therapy', BaldwinおよびByers 編, 159-173, 224-266 頁, Academic Press (1985) を参照のこと。これら全てが参考として本明細書中に組み込まれる。]

免疫系薬のデリバリー成分は、本発明のヒト免疫グロブリンを含むだろう。好ましくは完全な免疫グロブリンまたはそれらの結合性断片、例えば Fab が使用される。典型的には、免疫系薬中の抗体はヒト IgM または IgG イソタイプのものであるだろう。しかし所望の時には他の哺乳動物系常領域を用いることもできる。

本発明のヒト抗体およびその医薬組成物は、特に非癌口、即ち皮下、筋肉内または静脈内授与に有用である。非癌口授与用組成物は、通常、許容される量、好ましくは水性担体中に溶解された抗体の溶液または混合物を含んで成るだろう。様々な水性担体、例えば水、炭酸化された水、0.4% 食塩水、0.3% グリシン等を使用することができる。それらの溶液は無菌であり、通常は粒状物質を含まない。それらの組成物は、常用される周知の滅菌技術により滅菌することができる。該組成物は、適切な生理的条件に必要である時は医薬上許容される補助物質、例えばpH調整剤および緩衝剤、毒性調整剤等、例えば酢酸ナトリウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、乳酸ナトリウム等を含有することができる。それらの組成物中の抗体の量は広範囲に変わり得る。即ち、少なくとも約0.5%未満から、通常は少なくとも約1%から、15-20重量%ほどまでに及ぶことができ、そして液体の粘度、粘度等に主として基づいて、選択された特定の授与形式に従って選択されるだろう。

筋肉内注射用の典型的医薬組成物は、1mlの無菌緩衝液と50mgの抗体を含むように調製することができる。静脈点滴注入用の典型的医薬組成物は、250mlの無菌リンガー液と150mgの抗体を含むように調製することができる。非癌口授与可能な組成物の実際の調製方法は当業者に周知であるかまたは明白であり、そして例えばRemington's Pharmaceutical Science, 第15版, Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania (1980) 中に詳細に記載されており、これは参考として

本明細書中に組み込まれる。

本発明の抗体は貯蔵のために凍結乾燥させることができ、そして使用前に適切な担体中で再構成することができる。この技術は従来の免疫グロブリンに関して効果的であることが示されており、当業界で周知の凍結乾燥および再構成技術を用いることができる。凍結乾燥と再構成は様々な程度の抗体活性の低下をもたらす得ること (例えば従来の免疫グロブリンでは、IgM抗体はIgG抗体よりも大きな活性低下を有する傾向がある)、そして使用レベルを調整して埋め合わせなければならないことがあることは、当業者により明白であろう。

本発明のヒト抗体またはその混合物を含有する組成物は、予防および/または治療処置のために授与することができる。治療用途においては、組成物は、既に病気にかかっている患者に、病気を治療するかまたは少なくとも部分的に緩和するのに十分な量で授与される。これを達成するのに適切な量は「治療的有効量」と定義される。この用途に有効な量は、感染の程度および患者自身の免疫系の一般状態に依存するであろう。しかし通常は、用量あたり約1-約200mgの抗体、より好ましくは患者あたり5-25mgの用量が使用されるだろう。本発明の材料は通常は深刻な病状状態、即ち命にかかわるかまたはもしかすると命にかかわる状況において使用されるだろうことを全頭で服かなければならない。そのような場合、本発明のヒト抗体により達成される外来性物質の最小化および「外来物質」拒絶の低阻等の点からみて、実質的過剰量の抗体を授与することが可能でありそして治療に

より望ましいと感じられるかもしれない。

予防用途においては、本発明の抗体またはその混合物を含有する組成物は、患者の低抗体性を高めるためにまだ両方状態でない患者に投与される。そのような量は「予防的有効量」として定義される。この用途の場合、正確な量は患者の健康状態および免疫の一般レベルに依存するが、通常は用量あたり0.1〜25μg、特に患者あたり0.5〜2.5μgであろう。好ましい予防用途は、腎臓移植拒絶の防止である。

本発明のヒト抗体は、更に試験管内において広範な用途を見出すことができる。一例として、T細胞の型決定、特定のI-L-2レセプターを有する細胞または該レセプターの断片の単離、ワクチンの調製等に抗原的な抗体を利用することができる。

診断目的に、抗体を標識してもよくまたは未標識であってもよい。未標識抗体は、ヒト抗体と反応性である別の標識抗体（二次抗体）、例えばヒト免疫グロブリン定常領域に特異的な抗体と組合せて使用することができる。あるいは抗体を直接標識してもよい。様々な標識、例えば放射性核種、蛍光団、酵素、酵素基質、酵素補因子、酵素阻害剤、リゴンド（特にハプタン）、等を使用することができる。多数の型式のイムノアッセイが利用可能であり、そして当業者に周知である。

細胞活性に対する保護もしくは検出または選択された抗原の存在の検出において問題の抗体を使用するためにキットを供給することもできる。本発明の問題の抗体組成物は、単独

または所望の細胞タイプに特異的な追加の抗体と共に、普通は1つの容器に凍結乾燥状態で提供することができる。抗体は乾燥もしくは凍結と組合せていても未結合であってもよく、緩衝液、例えばTris、リン酸塩、炭酸塩等の緩衝液、安定剤、凝固剤、不活性タンパク質、例えば血清アルブミン等、および使用試明書のメットと共にキット中に含まれる。一般にそれらの材料は活性抗体の量を基にして約5重量%未満、通常は抗体濃度を基にして少なくとも約0.001重量%の合計量において存在するだろう。しばしば、活性成分を希釈するための不活性増量剤または緩衝剤を含めることが望ましく、この場合緩衝剤は全組成物の約1〜99重量%で存在することができる。キノラ抗体を組合せることができる二次抗体をアッセイにおいて使用することができ、これは通常は別の容器中に存在するだろう。二次抗体は典型的には乾燥と結合され、上述の抗体製剤と同様にして製剤化される。

次の実施例は例示の目的で与えられ、限定のためではない。

実 験

ヒト抗体および重鎖遺伝子の設計

ヒト抗体のフレームワークを提供するためにヒト抗体Euの配列(Sequences of Proteins of Immunological Interest, Kabat, E.ら, U.S. Dept. of Health and Human Services, 1983)を使用した。というのは、抗-Tacの重鎖のアミノ酸配列がNational Biomedical Foundation Protein Identification Resource 中の他のいずれの重鎖配列よりもこの抗体

の重鎖に相同性が高かったためである。

ヒト化重鎖の配列を選択するために、抗-Tac 重鎖配列（一般に知られたU.S.S.R.の186,862と223,037を参照のこと。これらは参考として本明細書中に組み込まれる）をEu重鎖配列と並列した（図1）。各位置において、その位置がどのカテゴリーのいずれか1つに入らない限り、Euアミノ酸をヒト化配列のために選択した。次のカテゴリーのいずれか1つに入る場合、抗-Tac アミノ酸を選択した。

(1) その位置が、Kabatら、前掲により定義されたような相補性決定領域(CDR)中にある（アミノ酸31-35、50-66、99-105）；

(2) その位置ではEuアミノ酸がヒト重鎖配列にまれであり、一方抗-Tac アミノ酸がその位置でヒト重鎖配列に典型的であった（アミノ酸27、93、95、98、107-109、111）；

(3) その位置が抗-Tac 重鎖のアミノ酸配列中のCDRのすぐ近くであった（アミノ酸30と67）；

(4) 抗-Tac 抗体の3次元モデルが、該アミノ酸が抗原結合部位に物理的に近接していることを示唆した（アミノ酸43と68）。

残りのアミノ酸はそれらのカテゴリーのうちの複数に入るが、それらは1つのカテゴリーにのみ挙げられる。

ヒト化重鎖の配列を選択するために、抗-Tac 軽鎖配列をEu軽鎖の配列と並列させた（図2）。その位置が同じカテゴリー（1）〜（4）のうちの1つに入らない限り、Euアミノ酸を各位置において選択した（カテゴリー定義中の重

鎖を軽鎖で置き換える）：

(1) CDR（アミノ酸24-34、50-55、89-97）。

(2) Euよりも抗-Tac アミノ酸がより典型的である（アミノ酸48と63）。

(3) CDRに近い（アミノ酸なし；Euと抗-Tac はこれらの位置全てにおいて互に同じであった）。

(4) 結合領域に3次元的に近接している可能性（アミノ酸60）。

重鎖（図3）と軽鎖（図4）の実際のスクレオチド配列は次のようにして選択した。

(1) 該スクレオチド配列は上述のようにして選択したアミノ酸配列をコードする。

(2) それらのコード配列の5'側のスクレオチド配列はリーダー（シグナル）配列、即ちMOPC 53抗体の軽鎖のリーダーおよびPCR 108A抗体の重鎖のリーダー（Kabatら、前掲）をコードする。これらのリーダー配列を抗体の典型として選択した。

(3) コード配列の3'側のスクレオチド配列は、抗-Tac配列の一部であるマウス軽鎖J5セグメントおよびマウス重鎖J5セグメントに該当配列である。これらの配列はスプライス供与配列を含有するために含まれる。

(4) 配列の各末端には、Iba（第10位での切断およびベクターのIbaI第10位へのクローニングを可能にするためのIbaI第10位が存在する。

ヒト化抗体および重鎖遺伝子の作製

重鎖を合成するために、Applied Biosystems 380B DNA合成装置を使って4つのオリゴヌクレオチド HES12, HES13, HES14, HES15 (図5A)を合成した。それらのオリゴヌクレオチドの2つは、重鎖の各鎖の一部であり、そして各オリゴヌクレオチドはアニーリングを可能にするために約20ヌクレオチドが次のヌクレオチドとオーバーラップしている (図5B)。該オリゴヌクレオチドは一緒にすると、XbaI 部位での切断を可能にするために各鎖に幾つかの余分なヌクレオチドを有する完全なヒト化重鎖をカバーする。該オリゴヌクレオチドをポリアクリルアミドゲルから精製した。

各オリゴヌクレオチドを、標準手順 (Maniatis, 前掲を参照のこと) によりATPとT4ポリヌクレオチドキナーゼを使ってリン酸化した。リン酸化したオリゴヌクレオチドをアニーリングするために、それらを各々約3.75μlの濃度において40μlのT4 (33mM Tris-HCl, pH7.9, 66mM 酢酸カリウム, 10mM 酢酸マグネシウム) 中に一緒に懸濁し、4分間95℃に加熱し、そして4℃にゆっくり冷却した。各オリゴヌクレオチドの反対鎖を合成することにより該オリゴヌクレオチドから完全な遺伝子を合成するために (図5B)、次の成分を 100 μlの最終容量において添加した:

- 10μl アニールしたオリゴヌクレオチド
- 各0.16mM デオキシリボヌクレオチド
- 0.5mM ATP
- 0.5mM DTT

ヌクレオチドをポリアクリルアミドゲルから精製した。

軽鎖遺伝子はそれらのオリゴヌクレオチドから2部分において合成した。JF01とJF02各々0.5μlを20μlのシークエナーゼ緩衝液 (40mM Tris-HCl, pH7.5, 20mM 塩化マグネシウム, 50mM 塩化ナトリウム) 中に混合し、70℃に3分間加熱し、そして該オリゴヌクレオチドをアニーリングさせるためにゆっくりと23℃まで冷却した。JF03とJF04も同様に処理した。各反応液をDTT 10mMおよび各デオキシヌクレオチド 0.5mMにし、6.5uのシークエナーゼ (US Biochemicals) を最終容量 24μlにおいて添加し、そして37℃で1時間インキュベートして該ヌクレオチドの反応方向鎖を合成した。各反応液に XbaI と HindIII を添加してDNAを消化した (JF02とJF03がオーバーラップする領域の中、従って合成されたDNAの各々の中にHindIII部位が存在する; 図6B)。反応液をポリアクリルアミドゲル上で泳動し、XbaI-HindIII断片を精製し、そして標準法により pUC18中にクローニングした。各断片について数個のプラスミド単離物をジデオキシ性により配列決定し、そして正しいものを選択した。

ヒト化抗体および重鎖を発現させるためのプラスミドの作製

重鎖 XbaI断片が挿入されている pUC19プラスミドから該断片を単離し、そして標準法により正しい方向においてベクターpVr1 (一般に提供されたU.S.S.N. 223,037を参照のこと) の XbaI 部位に挿入し、プラスミドp3uGTAC1 (図7) を作製した。このプラスミドは、適当な宿主細胞中にトランスフェクトすると高レベルの完全重鎖を発現するだろう。

10Gμ/μl BSA

3.5μ/μl T4 g43タンパク質 (DNAポリメラーゼ)

25μ/μl T4 g44/62タンパク質 (ポリメラーゼ補助タンパク質)

25μ/μl 45タンパク質 (ポリメラーゼ補助タンパク質)

この混合物を37℃で30分間インキュベートした。次いで10uのT4 DNAリガーゼを添加し、そして37℃で30分間インキュベートした。70℃で15分間反応液をインキュベートすることにより、ポリメラーゼとリガーゼを不活性化した。遺伝子を XbaI で消化するために、反応液に 200μ/μlのBSAと1mMのDTTを含む50μlの2×TA, 43μlの水、および5μl中の50uのXbaIを添加した。反応液を37℃で3時間インキュベートし、そしてゲル上で泳動した。ゲルから 43bpの XbaI断片を精製し、そして標準法によりプラスミドpUC19の XbaI部位中にクローニングした。4つのプラスミド単離物を精製し、ジデオキシ性を使って配列決定した。そのうちの1つが正しい配列を有した (図3)。

軽鎖を合成するために、4つのオリゴヌクレオチドJF01, JF02, JF03, JF04 (図6A)を合成した。それらのオリゴヌクレオチドの2つは、軽鎖の各鎖の一部であり、そして各オリゴヌクレオチドはアニーリングを可能にするために約20ヌクレオチドが次のヌクレオチドとオーバーラップしている (図6B)。該オリゴヌクレオチドは一緒にすると、XbaI 部位での切断を可能にするために各鎖に幾つかの余分なヌクレオチドを有する完全なヒト化軽鎖をカバーする。該オリ

2つの軽鎖 XbaI-HindIII断片が挿入されている各 pUC18プラスミドからそれらの断片を単離した。ベクタープラスミドpVr1 (一般に提供されたU.S.S.N. 223,037を参照のこと) を XbaI で切断し、標準法により限リン酸しそして2断片を連結せしめた。所望の反応生成物は次のような田状形を有する: ベクター-XbaI断片-HindIII断片-2-XbaI-ベクター。数個のプラスミド単離物を制限マッピングと配列決定により分析し、この形態を有する1つのプラスミドを選択した。このプラスミドp3uGTAC1 (図8) は完全なヒト化軽鎖 (図4) を含有し、適当な宿主細胞中にトランスフェクトすると高レベルの軽鎖を発現するだろう。

ヒト化抗体の合成および親和力

プラスミドp3uGTAC1およびp3uLTAC1をマウス Sp2/0細胞中にトランスフェクトし、そして該プラスミドを組み込んだ細胞を、プラスミド上の gptおよびhyg 遺伝子 (図7, 8) により付与されるミコフェノール酸および/またはヒグロマイシンBに対する耐性に基づいて標準法により選択した。それらの細胞がIL-2レセプターに結合する抗体を分泌したことを確かめるために、細胞からの上清をIL-2レセプターを発現することが知られている HUT-102細胞と共にインキュベートした。洗浄後、細胞をフルオレセイン接合ヤギ抗ヒト抗体と共にインキュベートし、洗浄し、そしてFACSscanサイトフルオロメーター上で蛍光について分析した。結果 (図9A) は、ヒト化抗体がそれらの細胞には結合するが、IL-2レセプターを発現しないJerkat T細胞には結合しない。

い(図9D)ことを明らかに示す。対照として、もとのマウス抗-Tac 抗体を用いてそれらの細胞を染色すると同様な結果を与えた(図9B、C)。

更なる実験のために、ヒト化抗体を生産する細胞をマウスに注入し、そして生じた腹水を回収した。腹水法に従って Affigel-10支持体(Bio-Rad Laboratories, Inc., Richmond, CA)上に固定されたナギ抗ヒト免疫グロブリン抗体のアフィニティカラムに通過させることにより、腹水からヒト化抗体を實質上均質まで精製した。もとの抗-Tac 抗体と比較してヒト化抗体の親和力を測定するために、競合的結合実験を行った。約 5×10^4 個の HUT-102 細胞を未知量(10-40ng)の抗-Tac 抗体とヒト化抗-Tac 抗体と共に4℃で10分間インキュベートした。次いで細胞に100ngのビオチン化抗-Tac を添加し、そして4℃で30分間インキュベートした。この量の抗-Tac は細胞上の結合部位を飽和するのに十分であり、大過剰であってはならないことが予め決定されている。0.1%アジ化ナトリウムを含む2mlのリン酸緩衝化塩溶液(PBS)で細胞を2回洗浄した。次いで250ngのフィコニトリン結合アビジンと共に細胞を4℃で30分間インキュベートし、この結合アビジンは既に細胞に結合しているビオチン化抗-Tac に結合した。細胞を上記のように再び洗浄し、1%パラホルムアルデヒドを含むPBS中で固定し、そしてFACSCANナイトフルオロメーター上で蛍光分析した。

第一段階における融合体としての抗-Tac 抗体の使用量を増加していくと(10-40ng)、第二段階において細胞に結合

することができたビオチン化抗-Tac の量を減少させ、従って最終段階において結合したフィコニトリン結合アビジンの量を減少させ、こうして蛍光を減少させた(図10A)。当量(20ng)の抗-Tac および融合体として使ったヒト化抗-Tac は、蛍光をほぼ同じ程度に減少させた(図10B)。このことは、それらの抗体がほぼ同じ親和力(3-4倍以内)を有することを示す。というのは、もし一方がずっと大きな親和力を有するなら、より有効にビオチン化抗-Tac と競争し、従って蛍光をもっと減少させたであろうからである。

ヒト化抗体の生物学的性質

ヒトの病気の処置における最適な使用のため、ヒト化抗体はIL-2レセプターを発現している体内のT細胞を破壊することができるべきである。抗体が標的細胞を破壊し得る1つの機構は、ADCCと称される抗体依存性細胞傷害作用(Fundamental Immunology, Paul, W. 編, Raven Press, New York (1984), 681頁)であり、この場合抗体は、標的細胞と標的を溶解することができるマクロファージのようなエフェクター細胞との間に架橋を形成する。ヒト化抗体と元のマウス抗-Tac 抗体がADCCを媒介することができるかどうかを決定するために、腹水法によりクロム放出アッセイを行った。詳しくは、IL-2レセプターを発現するヒト白血病 HUT-102 細胞を ^{51}Cr と共にインキュベートし、それらにこの放射性標識を吸収させた。次いで HUT-102 細胞を過剰量の抗-Tac またはヒト化抗-Tac 抗体のいずれか一方と共にインキュベートした。次にヒト細胞とIL-2との約20時間のインキュ

ベーションによって活性化された通常の精製ヒト末梢血単核細胞である30:1または100:1の比のエフェクター細胞と共に4時間インキュベートした。標的 HUT-102 細胞の溶解を示す ^{51}Cr の放出を測定し、そしてバックグラウンドを差し引いた(表1)。その結果は、どちらの比のエフェクター細胞においても、抗-Tac は有意な数の標的細胞を溶解しなかった(5%未満)が、一方ヒト化抗体は溶解した(20%より多く)ことを示す。従って、ヒト化抗体は、T細胞白血病または他のT細胞介在性の病気を治療することにおいて、おそらく元のマウス抗体よりも効果的であろう。

表 1
ADCC後の ^{51}Cr 放出率(%)

抗 体	エフェクター：標的比	
	30:1	100:1
抗-Tac	4%	<1%
ヒト化抗-Tac	24%	23%

上記から、本発明のヒト免疫グロブリンが他の抗体の多数の利点を提供することは明らかであろう。例えば、抗-Tac マウスモノクローナル抗体と比較すると、本発明のヒトIL-2レセプター免疫グロブリンは、より経済的に生産することができ、そして実質的に少ない外來アミノ酸配列を含むことができる。ヒト患者への注入後に抗原性となる可能性の減少は、上記の基礎に従って設計された免疫グロブリンによって有意な質的改善を意味する。

本発明を明確化および理解のために説明および実施例によ

り説明詳細に記載してきたが、添付の請求の範囲内で幾つかの変更および改良を行い得ることは明らかであろう。

```

1  3  5  7  9  11  13  15  17  19  21  23  25  27  29  31  33  35  37  39  41  43  45  47  49  51  53  55  57  59  61  63  65  67  69  71  73  75  77  79  81  83  85  87  89  91  93  95  97  99  101  103  105  107  109  111  113  115  117  119  121  123  125  127  129  131  133  135  137  139  141  143  145  147  149  151  153  155  157  159  161  163  165  167  169  171  173  175  177  179  181  183  185  187  189  191  193  195  197  199  201  203  205  207  209  211  213  215  217  219  221  223  225  227  229  231  233  235  237  239  241  243  245  247  249  251  253  255  257  259  261  263  265  267  269  271  273  275  277  279  281  283  285  287  289  291  293  295  297  299  301  303  305  307  309  311  313  315  317  319  321  323  325  327  329  331  333  335  337  339  341  343  345  347  349  351  353  355  357  359  361  363  365  367  369  371  373  375  377  379  381  383  385  387  389  391  393  395  397  399  401  403  405  407  409  411  413  415  417  419  421  423  425  427  429  431  433  435  437  439  441  443  445  447  449  451  453  455  457  459  461  463  465  467  469  471  473  475  477  479  481  483  485  487  489  491  493  495  497  499  501  503  505  507  509  511  513  515  517  519  521  523  525  527  529  531  533  535  537  539  541  543  545  547  549  551  553  555  557  559  561  563  565  567  569  571  573  575  577  579  581  583  585  587  589  591  593  595  597  599  601  603  605  607  609  611  613  615  617  619  621  623  625  627  629  631  633  635  637  639  641  643  645  647  649  651  653  655  657  659  661  663  665  667  669  671  673  675  677  679  681  683  685  687  689  691  693  695  697  699  701  703  705  707  709  711  713  715  717  719  721  723  725  727  729  731  733  735  737  739  741  743  745  747  749  751  753  755  757  759  761  763  765  767  769  771  773  775  777  779  781  783  785  787  789  791  793  795  797  799  801  803  805  807  809  811  813  815  817  819  821  823  825  827  829  831  833  835  837  839  841  843  845  847  849  851  853  855  857  859  861  863  865  867  869  871  873  875  877  879  881  883  885  887  889  891  893  895  897  899  901  903  905  907  909  911  913  915  917  919  921  923  925  927  929  931  933  935  937  939  941  943  945  947  949  951  953  955  957  959  961  963  965  967  969  971  973  975  977  979  981  983  985  987  989  991  993  995  997  999  1001  1003  1005  1007  1009  1011  1013  1015  1017  1019  1021  1023  1025  1027  1029  1031  1033  1035  1037  1039  1041  1043  1045  1047  1049  1051  1053  1055  1057  1059  1061  1063  1065  1067  1069  1071  1073  1075  1077  1079  1081  1083  1085  1087  1089  1091  1093  1095  1097  1099  1101  1103  1105  1107  1109  1111  1113  1115  1117  1119  1121  1123  1125  1127  1129  1131  1133  1135  1137  1139  1141  1143  1145  1147  1149  1151  1153  1155  1157  1159  1161  1163  1165  1167  1169  1171  1173  1175  1177  1179  1181  1183  1185  1187  1189  1191  1193  1195  1197  1199  1201  1203  1205  1207  1209  1211  1213  1215  1217  1219  1221  1223  1225  1227  1229  1231  1233  1235  1237  1239  1241  1243  1245  1247  1249  1251  1253  1255  1257  1259  1261  1263  1265  1267  1269  1271  1273  1275  1277  1279  1281  1283  1285  1287  1289  1291  1293  1295  1297  1299  1301  1303  1305  1307  1309  1311  1313  1315  1317  1319  1321  1323  1325  1327  1329  1331  1333  1335  1337  1339  1341  1343  1345  1347  1349  1351  1353  1355  1357  1359  1361  1363  1365  1367  1369  1371  1373  1375  1377  1379  1381  1383  1385  1387  1389  1391  1393  1395  1397  1399  1401  1403  1405  1407  1409  1411  1413  1415  1417  1419  1421  1423  1425  1427  1429  1431  1433  1435  1437  1439  1441  1443  1445  1447  1449  1451  1453  1455  1457  1459  1461  1463  1465  1467  1469  1471  1473  1475  1477  1479  1481  1483  1485  1487  1489  1491  1493  1495  1497  1499  1501  1503  1505  1507  1509  1511  1513  1515  1517  1519  1521  1523  1525  1527  1529  1531  1533  1535  1537  1539  1541  1543  1545  1547  1549  1551  1553  1555  1557  1559  1561  1563  1565  1567  1569  1571  1573  1575  1577  1579  1581  1583  1585  1587  1589  1591  1593  1595  1597  1599  1601  1603  1605  1607  1609  1611  1613  1615  1617  1619  1621  1623  1625  1627  1629  1631  1633  1635  1637  1639  1641  1643  1645  1647  1649  1651  1653  1655  1657  1659  1661  1663  1665  1667  1669  1671  1673  1675  1677  1679  1681  1683  1685  1687  1689  1691  1693  1695  1697  1699  1701  1703  1705  1707  1709  1711  1713  1715  1717  1719  1721  1723  1725  1727  1729  1731  1733  1735  1737  1739  1741  1743  1745  1747  1749  1751  1753  1755  1757  1759  1761  1763  1765  1767  1769  1771  1773  1775  1777  1779  1781  1783  1785  1787  1789  1791  1793  1795  1797  1799  1801  1803  1805  1807  1809  1811  1813  1815  1817  1819  1821  1823  1825  1827  1829  1831  1833  1835  1837  1839  1841  1843  1845  1847  1849  1851  1853  1855  1857  1859  1861  1863  1865  1867  1869  1871  1873  1875  1877  1879  1881  1883  1885  1887  1889  1891  1893  1895  1897  1899  1901  1903  1905  1907  1909  1911  1913  1915  1917  1919  1921  1923  1925  1927  1929  1931  1933  1935  1937  1939  1941  1943  1945  1947  1949  1951  1953  1955  1957  1959  1961  1963  1965  1967  1969  1971  1973  1975  1977  1979  1981  1983  1985  1987  1989  1991  1993  1995  1997  1999  2001  2003  2005  2007  2009  2011  2013  2015  2017  2019  2021  2023  2025  2027  2029  2031  2033  2035  2037  2039  2041  2043  2045  2047  2049  2051  2053  2055  2057  2059  2061  2063  2065  2067  2069  2071  2073  2075  2077  2079  2081  2083  2085  2087  2089  2091  2093  2095  2097  2099  2101  2103  2105  2107  2109  2111  2113  2115  2117  2119  2121  2123  2125  2127  2129  2131  2133  2135  2137  2139  2141  2143  2145  2147  2149  2151  2153  2155  2157  2159  2161  2163  2165  2167  2169  2171  2173  2175  2177  2179  2181  2183  2185  2187  2189  2191  2193  2195  2197  2199  2201  2203  2205  2207  2209  2211  2213  2215  2217  2219  2221  2223  2225  2227  2229  2231  2233  2235  2237  2239  2241  2243  2245  2247  2249  2251  2253  2255  2257  2259  2261  2263  2265  2267  2269  2271  2273  2275  2277  2279  2281  2283  2285  2287  2289  2291  2293  2295  2297  2299  2301  2303  2305  2307  2309  2311  2313  2315  2317  2319  2321  2323  2325  2327  2329  2331  2333  2335  2337  2339  2341  2343  2345  2347  2349  2351  2353  2355  2357  2359  2361  2363  2365  2367  2369  2371  2373  2375  2377  2379  2381  2383  2385  2387  2389  2391  2393  2395  2397  2399  2401  2403  2405  2407  2409  2411  2413  2415  2417  2419  2421  2423  2425  2427  2429  2431  2433  2435  2437  2439  2441  2443  2445  2447  2449  2451  2453  2455  2457  2459  2461  2463  2465  2467  2469  2471  2473  2475  2477  2479  2481  2483  2485  2487  2489  2491  2493  2495  2497  2499  2501  2503  2505  2507  2509  2511  2513  2515  2517  2519  2521  2523  2525  2527  2529  2531  2533  2535  2537  2539  2541  2543  2545  2547  2549  2551  2553  2555  2557  2559  2561  2563  2565  2567  2569  2571  2573  2575  2577  2579  2581  2583  2585  2587  2589  2591  2593  2595  2597  2599  2601  2603  2605  2607  2609  2611  2613  2615  2617  2619  2621  2623  2625  2627  2629  2631  2633  2635  2637  2639  2641  2643  2645  2647  2649  2651  2653  2655  2657  2659  2661  2663  2665  2667  2669  2671  2673  2675  2677  2679  2681  2683  2685  2687  2689  2691  2693  2695  2697  2699  2701  2703  2705  2707  2709  2711  2713  2715  2717  2719  2721  2723  2725  2727  2729  2731  2733  2735  2737  2739  2741  2743  2745  2747  2749  2751  2753  2755  2757  2759  2761  2763  2765  2767  2769  2771  2773  2775  2777  2779  2781  2783  2785  2787  2789  2791  2793  2795  2797  2799  2801  2803  2805  2807  2809  2811  2813  2815  2817  2819  2821  2823  2825  2827  2829  2831  2833  2835  2837  2839  2841  2843  2845  2847  2849  2851  2853  2855  2857  2859  2861  2863  2865  2867  2869  2871  2873  2875  2877  2879  2881  2883  2885  2887  2889  2891  2893  2895  2897  2899  2901  2903  2905  2907  2909  2911  2913  2915  2917  2919  2921  2923  2925  2927  2929  2931  2933  2935  2937  2939  2941  2943  2945  2947  2949  2951  2953  2955  2957  2959  2961  2963  2965  2967  2969  2971  2973  2975  2977  2979  2981  2983  2985  2987  2989  2991  2993  2995  2997  2999  3001  3003  3005  3007  3009  3011  3013  3015  3017  3019  3021  3023  3025  3027  3029  3031  3033  3035  3037  3039  3041  3043  3045  3047  3049  3051  3053  3055  3057  3059  3061  3063  3065  3067  3069  3071  3073  3075  3077  3079  3081  3083  3085  3087  3089  3091  3093  3095  3097  3099  3101  3103  3105  3107  3109  3111  3113  3115  3117  3119  3121  3123  3125  3127  3129  3131  3133  3135  3137  3139  3141  3143  3145  3147  3149  3151  3153  3155  3157  3159  3161  3163  3165  3167  3169  3171  3173  3175  3177  3179  3181  3183  3185  3187  3189  3191  3193  3195  3197  3199  3201  3203  3205  3207  3209  3211  3213  3215  3217  3219  3221  3223  3225  3227  3229  3231  3233  3235  3237  3239  3241  3243  3245  3247  3249  3251  3253  3255  3257  3259  3261  3263  3265  3267  3269  3271  3273  3275  3277  3279  3281  3283  3285  3287  3289  3291  3293  3295  3297  3299  3301  3303  3305  3307  3309  3311  3313  3315  3317  3319  3321  3323  3325  3327  3329  3331  3333  3335  3337  3339  3341  3343  3345  3347  3349  3351  3353  3355  3357  3359  3361  3363  3365  3367  3369  3371  3373  3375  3377  3379  3381  3383  3385  3387  3389  3391  3393  3395  3397  3399  3401  3403  3405  3407  3409  3411  3413  3415  3417  3419  3421  3423  3425  3427  3429  3431  3433  3435  3437  3439  3441  3443  3445  3447  3449  3451  3453  3455  3457  3459  3461  3463  3465  3467  3469  3471  3473  3475  3477  3479  3481  3483  3485  3487  3489  3491  3493  3495  3497  3499  3501  3503  3505  3507  3509  3511  3513  3515  3517  3519  3521  3523  3525  3527  3529  3531  3533  3535  3537  3539  3541  3543  3545  3547  3549  3551  3553  3555  3557  3559  3561  3563  3565  3567  3569  3571  3573  3575  3577  3579  3581  3583  3585  3587  3589  3591  3593  3595  3597  3599  3601  3603  3605  3607  3609  3611  3613  3615  3617  3619  3621  3623  3625  3627  3629  3631  3633  3635  3637  3639  3641  3643  3645  3647  3649  3651  3653  3655  3657  3659  3661  3663  3665  3667  3669  3671  3673  3675  3677  3679  3681  3683  3685  3687  3689  3691  3693  3695  3697  3699  3701  3703  3705  3707  3709  3711  3713  3715  3717  3719  3721  3723  3725  3727  3729  3731  3733  3735  3737  3739  3741  3743  3745  3747  3749  3751  3753  3755  3757  3759  3761  3763  3765  3767  3769  3771  3773  3775  3777  3779  3781  3783  3785  3787  3789  3791  3793  3795  3797  3799  3801  3803  3805  3807  3809  3811  3813  3815  3817  3819  3821  3823  3825  3827  3829  3831  3833  3835  3837  3839  3841  3843  3845  3847  3849  3851  3853  3855  3857  3859  3861  3863  3865  3867  3869  3871  3873  3875  3877  3879  3881  3883  3885  3887  3889  3891  3893  3895  3897  3899  3901  3903  3905  3907  3909  3911  3913  3915  3917  3919  3921  3923  3925  3927  3929  3931  3933  3935  3937  3939  3941  3943  3945  3947  3949  3951  3953  3955  3957  3959  3961  3963  3965  3967  3969  3971  3973  3975  3977  3979  3981  3983  3985  3987  3989  3991  3993  3995  3997  3999  4001  4003  4005  4007  4009  4011  4013  4015  4017  4019  4021  4023  4025  4027  4029  4031  4033  4035  4037  4039  4041  4043  4045  4047  4049  4051  4053  4055  4057  4059  4061  4063  4065  4067  4069  4071  4073  4075  4077  4079  4081  4083  4085  4087  4089  4091  4093  4095  4097  4099  4101  4103  4105  4107  4109  4111  4113  4115  4117  4119  4121  4123  4125  4127  4129  4131  4133  4135  4137  4139  4141  4143  4145  4147  4149  4151  4153  4155  4157  4159  4161  4163  4165  4167  4169  4171  4173  4175  4177  4179  4181  4183  4185  4187  4189  4191  4193  4195  4197  4199  4201  4203  4205  4207  4209  4211  4213  4215  4217  4219  4221  4223  4225  4227  4229  4231  4233  4235  4237  4239  4241  4243  4245  4247  4249  4251  4253  4255  4257  4259  4261  4263  4265  4267  4269  4271  4273  4275  4277  4279  4281  4283  4285
```


FORM 100-1 (Rev. 1-1-67)

1. NAME (Last, first, middle initial) **JOHN EDGAR HOOVER**

2. DATE OF BIRTH (Month, day, year) **1/20/1895**

3. PLACE OF BIRTH (City, State, Country) **Washington, D.C.**

4. SOCIAL SECURITY NUMBER **1-100-100000**

5. CURRENT ADDRESS (Street, City, State, Zip) **2500 R Street, N.W., Washington, D.C. 20037**

6. PREVIOUS ADDRESSES (Street, City, State, Zip) **1300 M Street, N.W., Washington, D.C. 20004**

7. EDUCATION (School, City, State, Year) **Harvard University, Cambridge, Mass., 1916**

8. EMPLOYMENT (Employer, City, State, Year) **U.S. Department of Justice, 1917-1935**

9. MARITAL STATUS (Married, Single, Divorced, Widowed) **Married**

10. SPOUSE (Name, Date of Birth, Date of Marriage) **Elizabeth Jane Holmes, 1/20/1895, 1917**

11. CHILDREN (Name, Date of Birth, Date of Marriage) **John Edgar Hoover, Jr., 1/20/1917, 1940**

12. RELIGION **Protestant**

13. RACE **White**

14. SEX **Male**

15. HEIGHT **5'10"**

16. WEIGHT **170 lbs.**

17. HAIR **Dark**

18. EYES **Blue**

19. SKIN **Fair**

20. BLOOD TYPE **O+**

21. FINGERPRINTS **Latent**

22. SIGNATURE **John Edgar Hoover**

23. DATE **02 JUL 1990**

24. OFFICE **FBI/DOJ**

25. AGENT **John Edgar Hoover**

FORM 100-2 (Rev. 1-1-67)

1. NAME (Last, first, middle initial) **JOHN EDGAR HOOVER**

2. DATE OF BIRTH (Month, day, year) **1/20/1895**

3. PLACE OF BIRTH (City, State, Country) **Washington, D.C.**

4. SOCIAL SECURITY NUMBER **1-100-100000**

5. CURRENT ADDRESS (Street, City, State, Zip) **2500 R Street, N.W., Washington, D.C. 20037**

6. PREVIOUS ADDRESSES (Street, City, State, Zip) **1300 M Street, N.W., Washington, D.C. 20004**

7. EDUCATION (School, City, State, Year) **Harvard University, Cambridge, Mass., 1916**

8. EMPLOYMENT (Employer, City, State, Year) **U.S. Department of Justice, 1917-1935**

9. MARITAL STATUS (Married, Single, Divorced, Widowed) **Married**

10. SPOUSE (Name, Date of Birth, Date of Marriage) **Elizabeth Jane Holmes, 1/20/1895, 1917**

11. CHILDREN (Name, Date of Birth, Date of Marriage) **John Edgar Hoover, Jr., 1/20/1917, 1940**

12. RELIGION **Protestant**

13. RACE **White**

14. SEX **Male**

15. HEIGHT **5'10"**

16. WEIGHT **170 lbs.**

17. HAIR **Dark**

18. EYES **Blue**

19. SKIN **Fair**

20. BLOOD TYPE **O+**

21. FINGERPRINTS **Latent**

22. SIGNATURE **John Edgar Hoover**

23. DATE **02 JUL 1990**

24. OFFICE **FBI/DOJ**

25. AGENT **John Edgar Hoover**

1. CLASS 17, is and 18, group to a commission of

2. CLASS 17, is and 18, group to a commission of

3. CLASS 17, is and 18, group to a commission of

4. CLASS 17, is and 18, group to a commission of

5. CLASS 17, is and 18, group to a commission of

6. CLASS 17, is and 18, group to a commission of

7. CLASS 17, is and 18, group to a commission of

8. CLASS 17, is and 18, group to a commission of

9. CLASS 17, is and 18, group to a commission of

10. CLASS 17, is and 18, group to a commission of

11. CLASS 17, is and 18, group to a commission of

12. CLASS 17, is and 18, group to a commission of

13. CLASS 17, is and 18, group to a commission of

14. CLASS 17, is and 18, group to a commission of

15. CLASS 17, is and 18, group to a commission of

16. CLASS 17, is and 18, group to a commission of

17. CLASS 17, is and 18, group to a commission of

18. CLASS 17, is and 18, group to a commission of

19. CLASS 17, is and 18, group to a commission of

20. CLASS 17, is and 18, group to a commission of

21. CLASS 17, is and 18, group to a commission of

22. CLASS 17, is and 18, group to a commission of

23. CLASS 17, is and 18, group to a commission of

24. CLASS 17, is and 18, group to a commission of

25. CLASS 17, is and 18, group to a commission of

FORM 100-3 (Rev. 1-1-67)

1. NAME (Last, first, middle initial) **JOHN EDGAR HOOVER**

2. DATE OF BIRTH (Month, day, year) **1/20/1895**

3. PLACE OF BIRTH (City, State, Country) **Washington, D.C.**

4. SOCIAL SECURITY NUMBER **1-100-100000**

5. CURRENT ADDRESS (Street, City, State, Zip) **2500 R Street, N.W., Washington, D.C. 20037**

6. PREVIOUS ADDRESSES (Street, City, State, Zip) **1300 M Street, N.W., Washington, D.C. 20004**

7. EDUCATION (School, City, State, Year) **Harvard University, Cambridge, Mass., 1916**

8. EMPLOYMENT (Employer, City, State, Year) **U.S. Department of Justice, 1917-1935**

9. MARITAL STATUS (Married, Single, Divorced, Widowed) **Married**

10. SPOUSE (Name, Date of Birth, Date of Marriage) **Elizabeth Jane Holmes, 1/20/1895, 1917**

11. CHILDREN (Name, Date of Birth, Date of Marriage) **John Edgar Hoover, Jr., 1/20/1917, 1940**

12. RELIGION **Protestant**

13. RACE **White**

14. SEX **Male**

15. HEIGHT **5'10"**

16. WEIGHT **170 lbs.**

17. HAIR **Dark**

18. EYES **Blue**

19. SKIN **Fair**

20. BLOOD TYPE **O+**

21. FINGERPRINTS **Latent**

22. SIGNATURE **John Edgar Hoover**

23. DATE **02 JUL 1990**

24. OFFICE **FBI/DOJ**

25. AGENT **John Edgar Hoover**

第1頁の続き

④Int. Cl. 3	識別記号	片内整理番号
A 61 K 39/395	U	8829-4C
C 07 K 15/06		7731-4H
C 12 N 5/10		
		15/13
[(C 12 P 21/08		
C 12 R 1:91)		

優先権主張 ④1989年2月13日④米国(U S)④310,252

④発明者 ゼリク, ハロルド エドウィン アメリカ合衆国, カリフォルニア 94002, ベルモント, サニー
スロープ アベニュー 1673